

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP99/05039

06.10.99

REC'D 26 NOV 1999

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年 9月17日

09/787360

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第263550号

出願人
Applicant(s):

大塚製薬株式会社

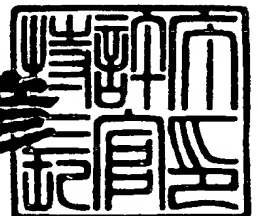
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年11月12日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-3077937

【書類名】 特許願

【整理番号】 20C8JP

【提出日】 平成10年 9月17日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/12

【発明の名称】 L Y 6 H 遺伝子

【請求項の数】 7

【発明者】

【住所又は居所】 徳島県鳴門市鳴門町高島字南 2 6 1

【氏名】 堀江 正人

【発明者】

【住所又は居所】 徳島県徳島市川内町上別宮北 5 1 - 1 アルペンロゼ 7
0 1

【氏名】 奥富 圭一

【発明者】

【住所又は居所】 徳島県徳島市川内町金岡 5 - 1 ラフォーレ I I 7 0 6

【氏名】 谷口 吉弘

【発明者】

【住所又は居所】 徳島県徳島市川内町加賀須野 4 6 3 - 3 0 今切寮

【氏名】 鈴木 幹生

【発明者】

【住所又は居所】 徳島県徳島市川内町加賀須野 4 6 3 - 3 0 今切寮

【氏名】 大渕 豊

【特許出願人】

【識別番号】 000206956

【住所又は居所】 東京都千代田区神田司町 2 丁目 9 番地

【氏名又は名称】 大塚製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100065215

【弁理士】

【氏名又は名称】 三枝 英二

【電話番号】 06-203-0941

【選任した代理人】

【識別番号】 100076510

【弁理士】

【氏名又は名称】 掛樋 悠路

【選任した代理人】

【識別番号】 100086427

【弁理士】

【氏名又は名称】 小原 健志

【選任した代理人】

【識別番号】 100090066

【弁理士】

【氏名又は名称】 中川 博司

【選任した代理人】

【識別番号】 100094101

【弁理士】

【氏名又は名称】 館 泰光

【選任した代理人】

【識別番号】 100099988

【弁理士】

【氏名又は名称】 斎藤 健治

【選任した代理人】

【識別番号】 100105821

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤井 淳

【選任した代理人】

【識別番号】 100099911

【弁理士】

【氏名又は名称】 関 仁士

【選任した代理人】

【識別番号】 100108084

【弁理士】

【氏名又は名称】 中野 睦子

【選任した代理人】

【識別番号】 100109438

【弁理士】

【氏名又は名称】 大月 伸介

【選任した代理人】

【識別番号】 100109427

【弁理士】

【氏名又は名称】 鈴木 活人

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001616

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9708032

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 LY6H遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号：1で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする塩基配列を含むLY6H遺伝子。

【請求項2】 塩基配列が配列番号：2で示されるものである請求項1に記載のLY6H遺伝子。

【請求項3】 以下の(a)及び(b)のいずれかのポリヌクレオチドからなるLY6H遺伝子：

(a) 配列番号：3で示される塩基配列の全部又は一部を含むポリヌクレオチド

(b) 配列番号：3で示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

【請求項4】 ヒト遺伝子である請求項1～3のいずれかに記載の遺伝子。

【請求項5】 LY6H遺伝子検出用の特異プローブ又は特異プライマーとして使用されるDNA断片である請求項1に記載の遺伝子。

【請求項6】 請求項1に記載の遺伝子によってコードされるLY6H蛋白質

【請求項7】 請求項6に記載のLY6H蛋白質に結合性を有する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、特に脳に特異的に強く発現しているLY6Hの遺伝子、より詳しくは、血液幹細胞の精製、血液細胞の分化の研究、免疫細胞の活性化、活性型免疫細胞の産生抑制、腫瘍治療等に利用されてきているLy6ファミリーに属する新しい蛋白質をコードする遺伝子に関する。また本発明は、かかる遺伝子によりコードされる新規な蛋白質及びその特異抗体にも関する。

【0002】

【従来の技術】

Ly6ファミリーに属する蛋白質は、低分子GPIアンカー構造を持ち、マウ

ス15番染色体上にクラスターを構成する細胞表面の糖蛋白質群として同定された [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 84, 1638-1643 (1987)]。

【0003】

Ly 6ファミリーは、骨髄細胞やリンパ球系細胞に特異的に強い発現を示すことから、T細胞の分化や造血幹細胞のマーカーとして利用されている [Immunol. Cell Biol., 73, 277-296 (1995)]。その生体内での機能は未だ不明な点が多いが、リンパ球系において高度に発現の調節がなされていることより、免疫系、とりわけT細胞の維持に重要な役割を果たしていると考えられる。例えばLy 6cは、インテグリン依存的な接着によるCD 8⁺T細胞のリンパ節への誘導を媒介しているとの報告がある [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 94, 6898-6903 (1997)]。

【0004】

多くのGPIアンカー蛋白質は、プロテインキナーゼと相互作用することが知られている [Science, 254, 1016-1019 (1991)]。例えば、p 56 lckやp 59 fynとLy 6とが相互作用することからT細胞のシグナルトランスダクションに関与する可能性が示唆されている [Eur. J. Immunol., 23, 825-831 (1993)]。また、Ly 6aを欠いたマウスから得られるT細胞は抗原性刺激に対する増殖能が増長されるという報告もなされている [J. Exp. Med., 186, 705-717 (1997)]。更に、T細胞のみならず、B細胞の活性化を調節している可能性も示唆されている [J. Immunol., 144, 2197-2204 (1990)]。

【0005】

更に、いくつかのGPIアンカー蛋白質は、リンパ球系及び神経系のいずれにも発現し、機能していることが知られている [Nature, 379, 826-829 (1996); Curr. Biol., 7, 705-708 (1997)]。Ly 6ファミリーでは、Ly 6a、2とLy 6Eとがいずれにも発現、機能していることが報告されている [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 85, 2255-2259 (1996); J. Immunol., 157, 969-973 (1996)]。

【0006】

かかるLy 6ファミリーに属する蛋白質及びこれをコードする遺伝子の生理的

役割の解明とそれにより得られる情報は、基礎科学研究の分野はもとより、医薬品分野においても、血液幹細胞の精製、血液細胞分化の研究、免疫細胞の活性化、免疫細胞の活性化の抑制、腫瘍の治療等の面で有用であると考えられる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、斯界で要望される上記情報、殊にヒトLy6ファミリーに属する新規な蛋白質およびこれをコードする遺伝子を提供することにある。

【0008】

上記目的より、本発明者は、各種ヒト組織由来の遺伝子につき検索を重ねた結果、該目的に合致する新しい脳特異的遺伝子の単離、同定に成功し、ここに本発明を完成するに至った。

【0009】

【課題を解決するための手段】

即ち、本発明によれば、配列番号：1で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする塩基配列を含むLY6H遺伝子、特に配列番号：2で示される塩基配列を含む当該遺伝子及びヒト遺伝子である当該遺伝子が提供される。

【0010】

また、本発明によれば、上記遺伝子によってコードされるLY6H蛋白質及びこれに結合性を有する特異抗体が提供される。

【0011】

更に、本発明によれば、以下の(a)及び(b)のいずれかのポリヌクレオチドからなるLY6H遺伝子、特にヒト遺伝子である当該遺伝子が提供される。

【0012】

(a) 配列番号：3で示される塩基配列の全部又は一部を含むポリヌクレオチド

(b) 配列番号：3で示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

【0013】

加えて、本発明によれば、Ly6遺伝子検出用の特異プローブ又は特異プライ

マーとして使用されるDNA断片である上記遺伝子が提供される。

【0014】

以下、本明細書におけるアミノ酸、ペプチド、塩基配列、核酸等の略号による表示は、IUPAC-IUBの規定 [IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984)]、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(特許庁編)及び当該分野における慣用記号に従うものとする。

【0015】

【発明の実施の形態】

本発明遺伝子の一具体例としては、後述する実施例に示される「LY6H」と名付けられたPCR産物のDNA配列から演繹されるものを挙げることができる。その塩基配列は、配列番号: 3に示されるとおりである。

【0016】

該遺伝子は、配列番号: 1に示される140アミノ酸配列の新規な脳特異的蛋白質(LY6H蛋白質という)をコードする420のオープンリーディングフレーム(ORF)を含むcDNAであり、全長854塩基からなっている。

【0017】

本発明遺伝子LY6Hの発現産物であるLY6H蛋白質は、FASTAプログラム(Person W. R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 85, 2444-2448 (1988))を利用したGenBank/EMBLデータベースの検索の結果、マウスLy6ファミリー蛋白質[Immunol. Cell Biol., 73, 277-296 (1995)]と、高い相同性が認められた。また、LY6H遺伝子においても、高い相同性が認められた。

【0018】

このことから、本発明遺伝子は、新規なLy6遺伝子と考えられる。

【0019】

本発明遺伝子は、ヒト胎児脳cDNAライブラリーから無作為に選択した28000以上のcDNAクローンの配列解析により、脳に特異的に発現する遺伝子として同定された。その染色体上の位置は、RHによる染色体マッピング[Hum. Mol. Genet., 5, 339-346 (1996)]の結果、8q24.3上に位置することが

判った。

【0020】

従って、本発明に係わる遺伝子LY6H及びその遺伝子産物の提供によれば、該遺伝子の各種組織での発現の検出や、ヒトLy6蛋白質の遺伝子工学的製造及びそれを用いた抗体の作成が可能であり、これらにより、血液幹細胞の精製、血液細胞の分化の研究、免疫細胞の活性化やその抑制、腫瘍の治療等が可能となると考えられる。

【0021】

本発明遺伝子は、具体的には配列番号：1で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする塩基配列を含む遺伝子又は配列番号：2で示される塩基配列を含む遺伝子として例示されるが、特にこれらに限定されることなく、例えば、上記特定のアミノ酸配列中に一定の改変を有する遺伝子や、上記特定の塩基配列と一定の相同性を有する遺伝子であることができる。

【0022】

即ち、本発明遺伝子には、配列番号：1に示されるアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする塩基配列を含む遺伝子もまた包含される。ここで、「アミノ酸の欠失、置換又は付加」の程度及びそれらの位置等は、改変された蛋白質が、配列番号：1で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質と同様の機能を有する同効物であれば特に制限されない。具体的には、ヒトLy6蛋白質の活性を保持するものが挙げられる。また、上記複数には、2以上、通常数個が含まれる。

【0023】

尚、これらアミノ酸配列の改変（変異）等は、天然において、例えば突然変異や翻訳後の修飾等により生じることもあるが、天然由来の遺伝子（例えば本発明の具体例遺伝子）に基づいて人為的に改変することもできる。本発明は、このような改変・変異の原因及び手段等を問わず、上記特性を有する全ての改変遺伝子を包含する。

【0024】

上記の人為的手段としては、例えばサイトスペシフィック・ミュータゲネシス

[Methods in Enzymology, 154: 350, 367-382 (1987); 同 100: 468 (1983); Nucleic Acids Res., 12: 9441 (1984); 続生化学実験講座 1 「遺伝子研究法II」、日本生化学会編, p105 (1986)] 等の遺伝子工学的手法、リン酸トリエステル法やリン酸アミダイト法等の化学合成手段 [J. Am. Chem. Soc., 89: 4801 (1967); 同91: 3350 (1969); Science, 150: 178 (1968); Tetrahedron Lett., 22: 1859 (1981); 同24: 245 (1983)] 及びそれらの組合せ方法等が例示できる。

【0025】

本発明遺伝子のひとつの態様としては、配列番号：3で示される塩基配列の全部或は一部を含むポリヌクレオチドからなる遺伝子を例示できる。この塩基配列に含まれるオープンリーディングフレームは、上記アミノ酸配列（配列番号：1）の各アミノ酸残基を示すコドンの一つの組合せ例でもあり、本発明遺伝子はこれに限らず、各アミノ酸残基に対して任意のコドンを組合せ選択した塩基配列を有することも勿論可能である。該コドンの選択は、常法に従うことができ、例えば利用する宿主のコドン使用頻度等を考慮することができる [Nucleic Acids Res., 9: 43 (1981)]。

【0026】

また、本発明遺伝子は、例えば配列番号：3の具体例で示されるように、一本鎖DNAの塩基配列として表示されるが、本発明はかかる塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドやこれらの両者を含むコンポーネントも当然に包含するものであり、また、cDNA等のDNAに限定されることもない。

【0027】

更に、本発明遺伝子は、前記のとおり、配列番号：3に示される塩基配列の全部又は一部を含むポリヌクレオチドからなるものに限定されず、当該塩基配列と一定の相同性を有する塩基配列からなるものも包含するものである。かかる遺伝子としては、少なくとも、下記に掲げるようなストリンジェントな条件下で、配列番号：2で示される塩基配列からなるDNAとハイブリダイズし、一定の条件下での洗浄してもこれより脱離しないものが挙げられる。

【0028】

即ち、配列番号：3の塩基配列を有するDNAと、6×SSC中65℃一夜の

条件下或は50%ホルムアミドを含む4×SSC中37℃一夜の条件下においてハイブリダイズし、2×SSC中65℃での30分間の洗浄条件下においても該DNAから脱離しない塩基配列を有する遺伝子が例示される。ここで、SSCは、標準食塩-クエン酸緩衝液である (standard saline citrate; 1×SSC = 0.15 M NaCl, 0.015M sodium citrate)。

【0029】

本発明の遺伝子は、その具体例についての配列情報に基づいて、一般的な遺伝子工学的手法により容易に製造・取得することができる [Molecular Cloning 2d Ed, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989); 続生化学実験講座「遺伝子研究法 I、II、III」、日本生化学会編 (1986) 等参照]。

【0030】

具体的には、本発明遺伝子が発現される適当な起源より、常法に従ってcDNAライブラリーを調製し、該ライブラリーから、本発明遺伝子に特有の適当なプローブや抗体を用いて所望クローンを選択することにより実施できる [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 78: 6613 (1981); Science, 222: 778 (1983)等]。

【0031】

上記において、cDNAの起源としては、本発明遺伝子を発現する各種の細胞、組織やこれらに由来する培養細胞等、特に脳組織が例示され、これらからの全RNAの分離、mRNAの分離や精製、cDNAの取得とそのクローニング等はいずれも常法に従い実施できる。尚、cDNAライブラリーは市販されてもおり、本発明においてはそれらcDNAライブラリー、例えばクローンテック社 (Clontech Lab. Inc.) より市販の各種cDNAライブラリー等を用いることもできる。

【0032】

本発明遺伝子をcDNAライブラリーからスクリーニングする方法も、特に制限されず、通常の方法に従うことができる。具体的には、例えばcDNAにより産生される蛋白質の特異抗体を使用した免疫的スクリーニングにより対応するcDNAクローンを選択する方法、目的のDNA配列に選択的に結合するプローブを用いたブランクハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション等

やこれらの組合せ等を例示できる。

【0033】

ここで用いられるプローブとしては、本発明遺伝子の塩基配列に関する情報をもとにして化学合成されたDNA等が一般的に例示できるが、勿論既に取得された本発明遺伝子そのものやその断片等も良好に利用できる。

【0034】

また、上記特異抗体に代えてLY6H蛋白質を利用した、蛋白質相互作用クローニング法 (protein interaction cloning procedure) によることもでき、更に、本発明遺伝子の塩基配列情報に基づき設定したセンス・プライマー、アンチセンス・プライマーをスクリーニング用プローブとして用いることもできる。

【0035】

本発明では、またディファレンシャルディスプレイ法 (differential display method, Liand P., et al., Science, 257, 967-971 (1992)) によって、異なる条件下の細胞もしくは複数の異なる細胞群間のmRNAの発現を直接比較、検討することができる。

【0036】

本発明遺伝子の取得に際しては、PCR法 [Science, 230: 1350 (1985)] によるDNA/RNA増幅法も好適に利用できる。殊に、ライブラリーから全長のcDNAが得られ難いような場合には、レース法 (RACE: Rapid amplification of cDNA ends; 実験医学, 12(6): 35 (1994))、殊に5' - レース (5' - RACE) 法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 8: 8998 (1988)] 等の採用が好適である。かかるPCR法の採用に際して使用されるプライマーは、既に本発明によって明らかにされた本発明遺伝子の配列情報に基づいて適宜設定でき、これは常法に従い合成できる。

【0037】

尚、増幅させたDNA/RNA断片の単離精製は、前記の通り常法に従うことができ、例えばゲル電気泳動法等によればよい。

【0038】

上記で得られる本発明遺伝子或は各種DNA断片は、常法、例えばジデオキシ

法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 74: 5463 (1977)] やマキサムーギルパート法 [Method in Enzymology, 65: 499 (1980)] 等に従って、また簡便には市販のシークエンスキット等を用いて、その塩基配列を決定することができる。

【0039】

本発明遺伝子の利用によれば、一般の遺伝子工学的手法を用いることにより、その遺伝子産物を容易に大量に安定して製造することができる。従って、本発明は、本発明にかかるLY6H遺伝子を含むベクター（発現ベクター）及び該ベクターによって形質転換された宿主細胞並びに該宿主細胞を培養することによりLY6H蛋白質を製造する方法をも提供するものである。

【0040】

該製造方法は、通常の遺伝子組換え技術 [Science, 224: 1431 (1984); Biochem. Biophys. Res. Comm., 130: 692 (1985); Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80: 5990 (1983)及び前記引用文献等参照] に従うことができる。

【0041】

上記宿主細胞としては、原核生物及び真核生物のいずれも用いることができ、例えば原核生物の宿主としては、大腸菌や枯草菌といった一般的に用いられるものが広く挙げられるが、好適には大腸菌、とりわけエシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K12株に含まれるものが例示できる。また、真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、酵母等の細胞が含まれ、前者としては、例えばサルの細胞であるCOS細胞 [Cell, 23: 175 (1981)] やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞及びそのジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 77: 4216 (1980)] 等が、後者としては、サッカロミセス属酵母細胞等が好適に用いられているが、これらに限定される訳ではない。

【0042】

原核生物細胞を宿主とする場合は、該宿主細胞中で複製可能なベクターを用いて、このベクター中に本発明遺伝子が発現できるように該遺伝子の上流にプロモーター及びSD（シャイン・アンド・ダルガーノ）塩基配列、更に蛋白合成開始に必要な開始コドン（例えばATG）を付与した発現プラスミドを好適に利用できる。上記ベクターとしては、一般に大腸菌由来のプラスミド、例えばpBR3

22、pBR325、pUC12、pUC13等がよく用いられるが、これらに限定されず既知の各種のベクターを利用することができる。大腸菌を利用した発現系に利用される上記ベクターの市販品としては、例えばpGEX-4T (Amersham Pharmacia Biotech)、pMAL-C2、pMAL-P2 (New England Biolabs社)、pET21、pET21/lacq (Invitrogen社)、pBAD/His (Invitrogen社)等を例示できる。

【0043】

脊椎動物細胞を宿主とする場合の発現ベクターとしては、通常、発現しようとする本発明遺伝子上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位及び転写終了配列等を保有するものが挙げられ、これは更に必要により複製起点を有していてもよい。該発現ベクターの例としては、具体的には、例えばSV40の初期プロモーターを保有するpSV2dhfr [Mol. Cell. Biol., 1: 854 (1981)] 等が例示できる。上記以外にも既知の各種の市販ベクターを用いることができる。動物細胞を利用した発現系に利用されるかかるベクターの市販品としては、例えばpEGFP-N、pEGFP-C (Clontech社)、pIND (Invitrogen社)、pcDNA3.1/His (Invitrogen社)等の動物細胞用ベクターや、pFastBacHT (Gibco BRL社)、pAcGH LT (PharMingen社)、pAc5/V5-His、pMT/V5-His、pMT/Bip/V5-His (以上Invitrogen社)等の昆虫細胞用ベクター等が挙げられる。

【0044】

また、酵母細胞を宿主とする場合の発現ベクターの具体例としては、例えば酸性ホスファターゼ遺伝子に対するプロモーターを有するpAM82 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80: 1 (1983)] 等が例示できる。市販の酵母細胞用発現ベクターには、例えばpPICZ (Invitrogen社)、pPICZ α (Invitrogen社)等が包含される。

【0045】

プロモーターとしても特に限定なく、エッシェリヒア属菌を宿主とする場合には、例えばトリプトファン(trp)プロモーター、lpp プロモーター、lac プロモーター、recA プロモーター、PL/PR プロモーター等を好適に利用できる。宿主

がバチルス属菌である場合は、例えばSP01 プロモーター、SP02 プロモーター、penP プロモーター等が好ましい。酵母を宿主とする場合のプロモーターとしては、例えばpH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター等を好適に利用できる。また動物細胞を宿主とする場合の好ましいプロモーターとしては、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオールインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーター等を例示できる。

【0046】

尚、本発明遺伝子の発現ベクターとしては、通常の融合蛋白発現ベクターも好ましく利用でき、該ベクターの具体例としては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合蛋白として発現させるための pGEX (Promega社) 等を例示できる。

【0047】

上記所望の組換えDNA (発現ベクター) の宿主細胞への導入方法・形質転換法にも特に制限はなく、一般的な各種方法を採用できる。また得られる形質転換体も、常法に従い培養することができ、該培養により本発明遺伝子によりコードされる目的のLY6H蛋白質が発現・産生され、形質転換体の細胞内、細胞外もしくは細胞膜上に蓄積もしくは分泌される。

【0048】

上記培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択利用でき、その培養も宿主細胞の生育に適した条件下で実施できる。

【0049】

かくして得られる組換え蛋白質 (LY6H蛋白質) は、所望により、その物理的性質、化学的性質等を利用した各種の分離操作従って分離、精製することができる〔「生化学データブックII」、1175-1259頁、第1版第1刷、1980年6月23日株式会社東京化学同人発行；Biochemistry, 25(25): 8274 (1986)；Eur. J. Biochem., 163: 313 (1987) 等参照〕。該方法としては、具体的には例えば通常の再構成処理、蛋白沈澱剤による処理 (塩析法)、遠心分離、浸透圧ショック法

、超音波破碎、限外濾過、分子篩クロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等が挙げられ、特に好ましい上記方法としては、本発明のLY6H蛋白質の特異抗体を結合させたカラムを利用するアフィニティクロマトグラフィーを例示できる。

【0050】

しかして、本発明は、例えば上記の如くして得られる、新規なLY6H蛋白質自体をも提供するものである。該蛋白質は、LY6Hとの結合活性を有することにより特徴付けられ、前記のとおり医薬分野において有用である。

【0051】

また、このLY6H蛋白質は、該蛋白質の特異抗体を作成するための免疫抗原としても利用できる。ここで抗原として用いられるコンポーネントは、例えば上記遺伝子工学的手法に従って大量に産生された蛋白或はそのフラグメントであることができ、これら抗原を利用することにより、所望の抗血清（ポリクローナル抗体）及びモノクローナル抗体を取得することができる。

【0052】

該抗体の製造方法自体は、当業者によく理解されているところであり、本発明においてもこれら常法に従うことができる〔続生化学実験講座「免疫生化学研究法」、日本生化学会編（1986）等参照〕。

【0053】

例えば、抗血清の取得に際して利用される免疫動物としては、ウサギ、モルモット、ラット、マウスやニワトリ等の通常動物を任意に選択でき、上記抗原を使用する免疫方法や採血等もまた常法に従い実施できる。

【0054】

また、モノクローナル抗体の取得も、常法に従い、上記免疫抗原で免疫した動物の形質細胞（免疫細胞）と形質細胞腫細胞との融合細胞を作成し、これより所望抗体を産生するクローンを選択し、該クローンの培養により実施することができる。免疫動物は、一般に細胞融合に使用する形質細胞腫細胞との適合性を考慮

して選択され、通常マウスやラット等が有利に用いられている。免疫は、上記抗血清の場合と同様であり、所望により通常のアジュバント等と併用して行なうこともできる。

【0055】

尚、融合に使用される形質細胞腫細胞としても、特に限定なく、例えば p3 (p3/x63-Ag8) [Nature, 256: 495-497 (1975)]、p3-U1 [Current Topics in Microbiology and Immunology, 81: 1-7 (1978)]、NS-1 [Eur. J. Immunol., 6: 511-519 (1976)]、MPC-11 [Cell, 8: 405-415 (1976)]、SP2/O [Nature, 276: 269-271 (1978)] 等、ラットにおける R210 [Nature, 277: 131-133 (1979)] 等及びそれらに由来する細胞等の各種の骨髓腫細胞をいずれも使用できる。

【0056】

上記免疫細胞と形質細胞腫細胞との融合は、通常の融合促進剤、例えばポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウイルス (HVJ) 等の存在下に公知の方法に準じて行なうことができ、所望のハイブリドーマの分離もまた同様に行ない得る [Meth. in Enzymol., 73: 3 (1981); 上記続生化学実験講座等]。

【0057】

また、目的とする抗体産生株の検索及び単一クローン化も常法により実施され、例えば抗体産生株の検索は、上記の本発明抗原を利用した ELISA 法 [Meth. in Enzymol., 70: 419-439 (1980)]、プラーク法、スポット法、凝集反応法、オクテロニー (Ouchterlony) 法、ラジオイムノアッセイ等の一般に抗体の検出に用いられている種々の方法に従い実施することができる。

【0058】

かくして得られるハイブリドーマからの本発明抗体の採取は、該ハイブリドーマを常法により培養してその培養上清として得る、また、ハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳動物に投与して増殖させその腹水として得る方法等により実施される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。このようにして得られる抗体は、更に塩析、ゲル濾過、アフィニティクロマトグラフィー等の通常の手段により精製することがで

きる。

【0059】

かくして得られる抗体は、本発明のLY6H蛋白質に結合性を有することによって特徴付けられ、これは、前述したLY6H蛋白質の精製及びその免疫学的手法による測定乃至識別等に有利に利用できる。本発明は、かかる新規な抗体をも提供するものである。

【0060】

また、本発明によって明らかにされた本発明遺伝子の配列情報を基にすれば、例えば該遺伝子の一部又は全部の塩基配列を利用することにより、個体もしくは各種組織における本発明遺伝子の発現の検出を行うことができる。

【0061】

かかる検出は常法に従って行うことができ、例えばRT-PCR [Reverse transcribed-Polymerase chain reaction; E.S. Kawasaki, et al., Amplification of RNA. In PCR Protocol, A Guide to methods and applications, Academic Press, Inc., San Diego, 21-27 (1991)] によるRNA増幅やノーザンブロット解析 [Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Lab. (1989)]、in situ RT-PCR [Nucl. Acids Res., 21: 3159-3166 (1993)] や in situ ハイブリダイゼーション等の細胞レベルでのそれら測定、NASBA法 [Nucleic acid sequence-based amplification, Nature, 350: 91-92 (1991)] 及びその他の各種方法によりいずれも良好に実施し得る。

【0062】

尚、RT-PCR法を採用する場合において、用いられるプライマーは、本発明遺伝子のみを特異的に増幅できる該遺伝子特有のものである限り何等限定されず、本発明の遺伝情報に基いてその配列を適宜設定することができる。通常、これは20～30ヌクレオチド程度の部分配列を有するものとすることができる。

【0063】

このように、本発明は、本発明にかかるLY6H遺伝子の検出用の特異プライマー及び／又は特異プローブとして使用されるDNA断片をも提供するものである。

【0064】

【発明の効果】

本発明によれば、新規な脳特異的遺伝子LY6H及びこれによりコードされる蛋白質が提供され、これらの利用によれば、血液幹細胞の精製、血液細胞の分化の研究、免疫細胞の活性化、活性型免疫細胞の産生抑制、腫瘍の治療等に有用な技術が提供される。

【0065】

【実施例】

以下、本発明を更に詳しく説明するため、実施例を挙げる。

【0066】

【実施例1】

(1) ヒトLY6H遺伝子のクローニング及びDNAシーケンシング

ヒト胎児脳より抽出したmRNAをクローンテック社より購入して出発材料とした。上記mRNAよりcDNAを合成し、ベクターλZAPII (ストラタジーン社製) に挿入し、cDNAライブラリーを構築した (大塚GENリサーチ・インスティテュート、大塚製薬株式会社)。インビボ・エキシジョン法 (in vivo excision: Short, J. M., et al., Nucleic Acids Res., 16, 7583-7600 (1988)) によって寒天培地上にヒト遺伝子を含む大腸菌コロニーを形成させ、ランダムにそのコロニーをピックアップし、96ウェルマイクロプレートにヒト遺伝子を含む大腸菌クローンを登録した。登録されたクローンは、-80℃にて保存した。

【0067】

次に登録した各クローンを1.5mlのLB培地で一昼夜培養し、プラスミド自動抽出装置PI-100 (クラボウ社製) を用いてDNAを抽出精製した。尚、コンタミした大腸菌のRNAは、RNase処理により分解除去した。最終的に30μlに溶解し、2μlはミニゲルによりおおまかにDNAのサイズ及び量をチェックした。その7μlをシーケンス反応用に使い、残りの21μlは、プラスミドDNAとして4℃に保存した。また、この方法は若干のプログラム変更によって後記に示されるFISH (fluorescence in situ hybridization) のプ

ローブ用としても使用可能なコスミドを抽出することができる。

【0068】

続いてT3、T7、或は合成オリゴヌクレオチド・プライマーを用いるサンガーらのジデオキシターミネーター法 (Sanger, F., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 5463-5467 (1977)) 或はジデオキシターミネーター法にPCR法を加味した方法であるサイクルシーケンス法 (Carothers, A.M., et al., Bio. Techniques, 7, 494-499 (1989)) を実施した。之等の方法は少量のプラスミドDNA (およそ0.1-0.5 μ g) をテンプレート (鋳型) として4種の塩基を特異的に停止する伸長反応させる方法である。

【0069】

シーケンスプライマーとして、FITC (fluorescein isothiocyanate) 蛍光標識したものを使用し、Taqポリメラーゼにより約25サイクル反応させた。蛍光標識したDNA断片につき、自動DNAシーケンサー、ALFTM DNAシーケンサー (ファルマシア社製) によりcDNAの5'末端側から約400塩基の配列を決定した。

【0070】

3'非翻訳領域は、各遺伝子の異質性 (heterogeneity) が高く、個々の遺伝子を区別するのに適しているので、場合によっては、3'側のシーケンスも行った。

【0071】

DNAシーケンサーで得られた膨大な塩基配列情報を、64ビットのコンピュータDEC3400に転送し、コンピュータによるホモロジー解析を行なった。該ホモロジー解析は、UWCGGのFASTAプログラム (Pearson, W.R. and Lipman, D. J., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 85, 2444-2448 (1988)) によるデータベース (GenBank, EMBL) 検索により行なった。

【0072】

ヒト胎児脳cDNAライブラリーについての上記解析方法は、藤原ら [Fujiwara, T., et al., DNA Res., 2, 107-111 (1991)] に詳述されている。

【0073】

上記と同様な方法で、構築されたヒト胎児脳 cDNA ライブラリーから無作為に選択した ESTs (expressed sequence tags: 発現遺伝子断片の部分 DNA 配列) の配列決定を実施した。

【0074】

FASTA プログラムによる Gene Bank と EMBL の配列検索の中で、GEN-425D01 と命名したクローンが、マウス Ly6 ファミリー蛋白質をコードする遺伝子と高い相同性を示すことを発見した。

【0075】

テンプレート (鋳型) としてベクター (pBluescript vector: ストラタジーン社製 (Stratagene)) 内に挿入された二本鎖 DNA と、プライマーとしての合成オリゴヌクレオチドとを使用して、サンガーらのジデオキシ・チェーン・ターミネーション法によって、上記クローンの有する全コード領域を含む cDNA の塩基配列を決定した。

【0076】

上記で得られたクローンの cDNA 配列は、ABI PRISM™ 377 自動 DNA シークエンサーによる配列決定の結果、420 塩基の推定アミノ酸翻訳領域を含んでおり、これによってコードされるアミノ酸配列は、140 アミノ酸残基を有し、全長 cDNA クローンの核酸配列は、854 塩基からなっていた。その全配列は、配列番号: 3 に示す通りであり、オープン・リーディング・フレーム k 核酸配列は配列番号: 2 に、該酸配列でコードされるアミノ酸の推定アミノ酸配列は配列番号: 1 に示す通りであった。

【0077】

他の Ly6 ファミリー蛋白質と本ヒト LY6H とのアミノ酸配列を比較検討し、またアミノ酸翻訳開始領域に保存されている塩基配列 (Kozak, M., J. Biol. Chem., 266, 19867-19870 (1991)) と該ヒト LY6H 遺伝子の 5' 領域の比較より決定された開始コドンは、配列番号: 3 の塩基配列の 2 番号の ATG トリプレットである 99-101 番目に位置していた。また、ポリアデニレーション・シグナル (AATAAA) は、同塩基配列番号の 832-837 番目に位置していた。

【0078】

(2) ノーザンブロット分析

組織におけるLY6Hの発現プロファイルを調べるため、各種のヒト組織を用いたノーザンブロット分析を行った。

【0079】

ノーザン・ブロット分析には、ヒトMTN (Multiple-Tissue Northern) ブロットIとII (クローンテック社製) を使用した。

【0080】

cDNA断片は、T3とT7プロモーター配列のプライマー・セットを用い、PCRによって $[\alpha-^{32}\text{P}]$ -dCTPで標識した。

【0081】

増幅産物を含むメンブランをプレハイブリダイズ (条件は製品のプロトコールに従った) し、そしてそれから製品のプロトコールに従い、ハイブリダイゼーションを行なった。

【0082】

ハイブリダイゼーション後、洗浄した膜を -80°C で24時間オートラジオグラフに露光した。

【0083】

上記GEN-425D01 cDNAクローンのPCR増幅産物を $[\text{P}^{32}]$ -dCTP (ランダムプライムドDNAラベリングキット、ベーリンガー・マンハイム社) により標識してプローブとした。

【0084】

ブロッティングは、 65°C で一晩、 $1\text{M NaCl}/50\text{mM}$ トリスHCl ($\text{pH} 7.5$) / $2\times$ デンハルツ溶液 / 10% デキストランサルフェート / 1% SDS溶液 ($100\mu\text{g}/\text{ml}$ 変性サケ精子DNA含有) の溶液中でハイブリダイズした。 $2\times\text{SSC}/0.1\%$ SDSにて室温下にて2回洗浄後、次いで $0.1\times\text{SSC}/0.1\%$ SDSにて 65°C 下に40分間で1回洗浄した。フィルターは -70°C 下に18時間、X線フィルム(コダック社製)に対して露光した。

【0085】

ヒト成人組織として、脳 (brain)、膵臓 (Pancreas)、精巣 (testis)、小腸 (Small intestine)、結腸 (Colon)、胸腺 (Thymus)、前立腺 (prostate)、卵巣 (Ovary)、心臓 (Heart)、胎盤 (Placenta)、肺 (Lung)、肝臓 (Liver)、骨格筋 (Skeletal muscle)、腎臓 (Kidney)、脾臓 (Spleen)、胎盤 (Testis) 及び末梢血白血球 (Peripheral blood leukocyte) を用いて上記試験を行なった結果、LY6Hに相同する約1kbの転写体が、脳 (brain)、膵臓 (Pancreas)、精巣 (testis)、小腸 (Small intestine)、結腸 (Colon)、胸腺 (Thymus)、前立腺 (prostate) 及び卵巣 (Ovary)、特に脳において強く観察された。

【0086】

(3) FISHによるコスミド・クローンと染色体の局在

染色体の整列のためのFISHは、公知の方法(Takahashi E., et al., Hum. Genet., 86, 14-16 (1990))に従って、各コスミドDNAの0.5 μ gをプローブとして使用して実施した。FISHはプロビア100フィルム(フジ社製、ISO100)又はCCDカメラ・システム(アプライド・イメージング、サイトビジョン社製)によって捕えられた。

【0087】

その結果、ヒトLY6H遺伝子は、第8染色体のバンドq24.3上に位置することが判った。即ちGEN-425D01は、染色体バンド8q24.3上にマップされた。

【0088】

Ly6ファミリーに属する蛋白質に対する抗体は、遺伝子治療のターゲットとなる血液幹細胞の精製 (van de Rijn, M., et al., proc.Natl.Acad.Sci., USA., 86, 4634-4638 (1989))、血液細胞の分化の研究 (van de Rijn, M., et al., proc.Natl.Acad.Sci., USA., 86, 4634-4638 (1989); Classon, B.J. and Covey, L., Proc.Natl.Acad.Sci., USA., 91, 5296-5300 (1994))、免疫細胞の活性化 (Malek, T.R., et al., J.Exp.Med., 164, 709-722 (1986))、活性型免疫細胞の産生抑制 (Haque, A., et al., Immunology, 69, 558-563 (1990)) 等に

利用されており、また、抗腫瘍効果も認められている (Lu, L., et al., J. Immunol., 142, 719-725 (1989))。本実施例により提供されるヒトLY6H遺伝子の利用によれば、該遺伝子の各組織での発現の検出や、ヒトNMLY6蛋白の遺伝子工学的製造及びそれを用いた抗体の作成が可能となり、これにより、上記のような血液幹細胞の精製、血液細胞の分化の研究、免疫細胞の活性化、免疫細胞の活性化の抑制、腫瘍の治療等が可能となる。

【0089】

また、脳に強く発現しているLY6Hは、神経細胞の分化の研究、神経細胞の活性化、神経及び精神疾患の治療も可能となる。

【0090】

ヒトLY6H蛋白質をターゲットとした化合物のスクリーニングも可能となり、かくして得られる化合物には、抗ヒトLY6H蛋白抗体と同様の有用性がある。

【 0 0 9 1 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Ostuka Pharmaceutical Co., ltd.

<120> LY6H gene

<130> 20C8JP

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 140

<212> PRT

<213> human embryonic brain

<400> 1

Met Leu Pro Ala Ala Met Lys Gly Leu Gly Leu Ala Leu Leu Ala Val

1 5 10 15

Leu Leu Cys Ser Ala Pro Ala His Gly Leu Trp Cys Gln Asp Cys Thr

20 25 30

Leu Thr Thr Asn Ser Ser His Cys Thr Pro Lys Gln Cys Gln Pro Ser

35 40 45

Asp Thr Val Cys Ala Ser Val Arg Ile Thr Asp Pro Ser Ser Ser Arg

50 55 60

Lys Asp His Ser Val Asn Lys Met Cys Ala Ser Ser Cys Asp Phe Val

65 70 75 80

Lys Arg His Phe Phe Ser Asp Tyr Leu Met Gly Phe Ile Asn Ser Gly

85 90 95

Ile Leu Lys Val Asp Val Asp Cys Cys Glu Lys Asp Leu Cys Asn Gly

100 105 110

Ala Ala Gly Ala Gly His Ser Pro Trp Ala Leu Ala Gly Gly Leu Leu

115 120 125

Leu Ser Leu Gly Pro Ala Leu Leu Trp Ala Gly Pro

130

135

140

<210> 2

<211> 420

<212> DNA

<213> human embryonic brain

<400> 2

atgctgcctg cagccatgaa gggcctcggc ctggcgctgc tggccgtcct gctgtgctcg 60
gcgcccgtc atggcctgtg gtgccaggac tgcaccctga ccaccaactc cagccattgc 120
accccaaagc agtgccagcc gtccgacacg gtgtgtgcca gtgtccgaat caccgatccc 180
agcagcagca ggaaggatca ctcggtgaac aagatgtgtg cctcctcctg tgacttcgtt 240
aagcgacact ttttctcaga ctatctgatg gggtttatta actctgggat cttaaaggtc 300
gacgtggact gctgcgagaa ggatttgtgc aatggggcgg caggggcagg gcacagcccc 360
tgggccctgg ccggggggct cctgctcagc ctggggcctg ccctcctctg ggctgggccc 420

<210> 3

<211> 854

<212> DNA

<213> human embryonic brain

<220>

<221> CDS

<222> (99)..(518)

<400> 3

acgccgcccc agcccggagt gcggacaccc ccgggatgct tgcgccccag aggacccgcg 60
ccccaagccc ccgcgcccgc cccaggccca cccggagc atg ctg cct gca gcc atg 116

Met Leu Pro Ala Ala Met

1

5

aag ggc ctc ggc ctg gcg ctg ctg gcc gtc ctg ctg tgc tcg gcg ccc 164

Lys Gly Leu Gly Leu Ala Leu Leu Ala Val Leu Leu Cys Ser Ala Pro

10

15

20

gct cat ggc ctg tgg tgc cag gac tgc acc ctg acc acc aac tcc agc 212
 Ala His Gly Leu Trp Cys Gln Asp Cys Thr Leu Thr Thr Asn Ser Ser
 25 30 35
 cat tgc acc cca aag cag tgc cag ccg tcc gac acg gtg tgt gcc agt 260
 His Cys Thr Pro Lys Gln Cys Gln Pro Ser Asp Thr Val Cys Ala Ser
 40 45 50
 gtc cga atc acc gat ccc agc agc agc agg aag gat cac tcg gtg aac 308
 Val Arg Ile Thr Asp Pro Ser Ser Ser Arg Lys Asp His Ser Val Asn
 55 60 65 70
 aag atg tgt gcc tcc tcc tgt gac ttc gtt aag cga cac ttt ttc tca 356
 Lys Met Cys Ala Ser Ser Cys Asp Phe Val Lys Arg His Phe Phe Ser
 75 80 85
 gac tat ctg atg ggg ttt att aac tct ggg atc tta aag gtc gac gtg 404
 Asp Tyr Leu Met Gly Phe Ile Asn Ser Gly Ile Leu Lys Val Asp Val
 90 95 100
 gac tgc tgc gag aag gat ttg tgc aat ggg gcg gca ggg gca ggg cac 452
 Asp Cys Cys Glu Lys Asp Leu Cys Asn Gly Ala Ala Gly Ala Gly His
 105 110 115
 agc ccc tgg gcc ctg gcc ggg ggg ctc ctg ctc agc ctg ggg cct gcc 500
 Ser Pro Trp Ala Leu Ala Gly Gly Leu Leu Leu Ser Leu Gly Pro Ala
 120 125 130
 ctc ctc tgg gct ggg ccc tgatgtctcc tccttccac ggggcttctg 548
 Leu Leu Trp Ala Gly Pro
 135 140
 agcttgctcc cctgagcctg tggctgccct ctccccagcc tggcgtggct ggggctgggg 608
 gcagccttgg cccagctccg tggctgtggc ctgtggctct cactcctccc ccgacgtgaa 668
 gcctccctgt ctctccgcca gctctgagtc ccaggcagct ggacatctcc aggaaaccag 728
 gccatctggg caggaggcct ggggatgagg gtgggggggg acccccaggt cccggagggg 788
 aagtgaagca acagcccagc tggaaggcg tcttctgcgg agaaataaag tcacttttga 848

特平 1 0 - 2 6 3 5 5 0

gtcctg

854

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 例えば腫瘍の治療等に有用な脳特異的遺伝子を提供。

【解決手段】 配列番号：1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む遺伝子。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000206956
【住所又は居所】	東京都千代田区神田司町2丁目9番地
【氏名又は名称】	大塚製薬株式会社
【代理人】	申請人
【識別番号】	100065215
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】	三枝 英二
【選任した代理人】	
【識別番号】	100076510
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】	掛樋 悠路
【選任した代理人】	
【識別番号】	100086427
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】	小原 健志
【選任した代理人】	
【識別番号】	100090066
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】	中川 博司
【選任した代理人】	
【識別番号】	100094101
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】	館 泰光
【選任した代理人】	
【識別番号】	100099988
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】	斎藤 健治
【選任した代理人】	

【識別番号】	100105821
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】	藤井 淳
【選任した代理人】	
【識別番号】	100099911
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】	関 仁士
【選任した代理人】	
【識別番号】	100108084
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】	中野 睦子
【選任した代理人】	
【識別番号】	100109438
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】	大月 伸介
【選任した代理人】	
【識別番号】	100109427
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】	鈴木 活人

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000206956]

1. 変更年月日 1990年 8月27日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都千代田区神田司町2丁目9番地
氏 名 大塚製薬株式会社